

2,22 μM de 6-BAP también presentaban forma elíptica típica y hundidos en el parénquima, pero en comparación con el control, estos se encontraban semiabiertos (Figs. 8C y 8D).

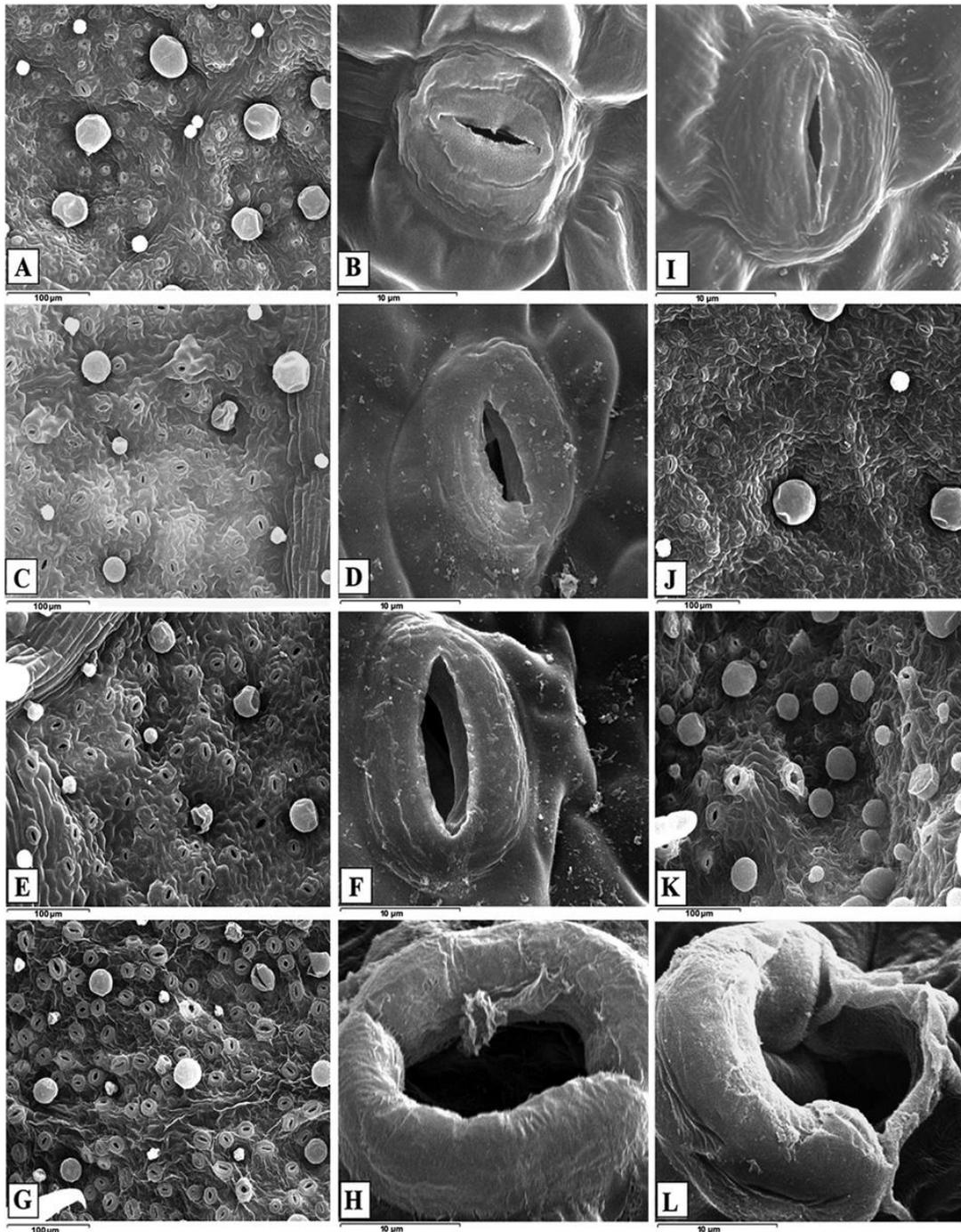


Figura 8. Comparación de la superficie abaxial (microscopía electrónica de barrido) de la hoja de brotes de *Tectona grandis* L., cultivados en los SIT con diferentes concentraciones de 6-BAP, a las cuatro semanas de cultivo. A, B) Brotes cultivados sin 6-BAP (Control). C, D) con 2,22 μM de 6-BAP. E, F) con 4,44 μM de 6-BAP. G, H) con 6,66 μM de 6-BAP. I, J) plantas en invernadero. K, L) hojas de brotes hiperhídricos obtenidos en el tratamiento con 6,66 μM de 6-BAP. (A, C, E, G, J, barras = 100 μm , 270X). (K, barra= 100 μm , 350X). (B, D, F, H, J, L, barras = 10 μm , 4000x).

En las plantas cultivadas con 4,44 μM de 6-BAP, los estomas mantenían la forma elíptica (Figs. 8E y 8F), pero se encontraban la gran mayoría abiertos y ubicados al mismo nivel de las células del parénquima, aunque se observaron algunos estomas elevados sobre la epidermis. Sin embargo, en la concentración más elevada de 6-BAP, los estomas se observaron en forma de anillos, marcadamente abiertos y casi todos elevados sobre el parénquima de la hoja (Figs. 8G y 8H). Solo las hojas de las plantas cultivadas sin 6-BAP y con 2,22 μM de 6-BAP mostraban una morfología de los estomas similar al de plantas cultivadas en invernadero (Figs. 8I y 8J), no así las plantas cultivadas con 6,66 μM de 6-BAP, las cuales mostraron características similares a los estomas de BH (Figs. 8K y 8L).

Los estomas de las hojas de los brotes de teca cultivados en los SIT sin 6-BAP, con 2,22 μM de 6-BAP mostraron heterogeneidad de tamaño y una forma elíptica, lo cual es atribuible a la presencia de estomas en diferentes estados de desarrollo. La forma elíptica es típica de las plantas que crecen en condiciones *in vivo* (Pospíšilová *et al.*, 1999) y es característica de plantas cultivadas *in vitro* de *Nicotiana tabacum* L. (Tichá *et al.*, 1999), *Simmondsia chinensis* (Link) Schn (Apóstolo y Llorente, 2000) y *Eucalyptus grandis* \times *Eucalyptus urophylla* (Louro *et al.*, 1999) que muestran un desarrollo normal durante la fase de multiplicación-crecimiento y enraizamiento *in vitro*.

Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de estomas en su mayoría cerrados en los brotes cultivados sin 6-BAP o semiabiertos en el tratamiento con 2,22 μM de 6-BAP podría ser un indicador de que estas plantas han desarrollado estomas funcionales, con un mecanismo de apertura y cierre estomático adecuado. Sin embargo, todo lo contrario sucede con los brotes cultivados con la concentración más elevada de 6-BAP (6,66 μM), las anomalías estructurales observadas en el complejo estomático y la excesiva apertura de los estomas, podrían indicar que los estomas no han desarrollado un adecuado mecanismo de cierre estomático, por lo que probablemente estas plantas serán más susceptibles a la deshidratación durante la transferencia *ex vitro*.

El incremento del 6-BAP provocó un aumento proporcional de las dimensiones de los estomas y una mayor apertura estomática. Estos resultados coinciden con los descritos por Moncaleán *et al.* (2007) en brotes de *Actinidia deliciosa* L. cultivados *in vitro*, estos autores refieren un aumento significativo del largo y del ancho de los estomas cuando la concentración de 6-BAP fue superior a 4,44 μM .

El incremento de la apertura estomática fue proporcional con el aumento del contenido de agua en los brotes, por lo que probablemente una mayor acumulación de agua en las células oclusivas, podría ser la causa de la mayor apertura estomática. El mecanismo mediante el cual las citoquininas favorecen la apertura estomática es poco conocido, pero una de las causas podría ser por efecto indirecto de este tipo de regulador sobre los precursores del ácido abscísico (ABA), la hormona que promueve el cierre estomático.

Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y detección de ligninas en secciones del tallo

El contenido de compuestos fenólicos disminuyó proporcionalmente con el incremento de la concentración de 6-BAP. Los valores más altos se determinaron en el control (41,2 mgEAG.gMS⁻¹), mientras que los más bajos (14,1 mgEAG.gMS⁻¹) en el tratamiento con 6,66 μM de 6-BAP (Fig. 9).

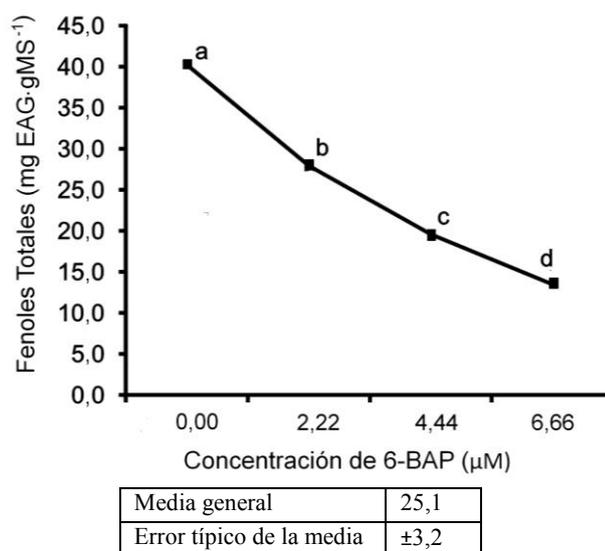


Figura 9. Contenido de compuestos fenólicos totales de brotes de *Tectona grandis* L. cultivados en los SIT con diferentes concentraciones de 6-BAP, a las cuatro semanas de cultivo. Medias con letras distintas difieren estadísticamente (ANOVA simple; Tukey; $p \leq 0.05$, $n=9$).

El estudio histoquímico permitió demostrar que la concentración de 6-BAP influyó en la deposición de ligninas en las células vasculares. Se observó en las secciones transversales de los brotes cultivados sin 6-BAP teñidas con floroglucinol-HCl una región bien definida de color magenta, además de un sistema vascular bien organizado con un patrón de lignificación homogéneo (Fig. 10A).

En los brotes cultivados con 2,22 μM de 6-BAP, la organización del xilema fue normal, con la formación de ases radiales, aunque no todas las células se observaban lignificadas (Fig. 10B). Sin

embargo, la organización del xilema en los brotes cultivados con 4,44 y 6,66 μM de 6-BAP fue pobre y el área de la sección transversal teñida positivamente con floroglucinol-HCL mostró un patrón de deposición inconsistente, poco identificable y con escasa lignificación (Figs. 10C y 10D).

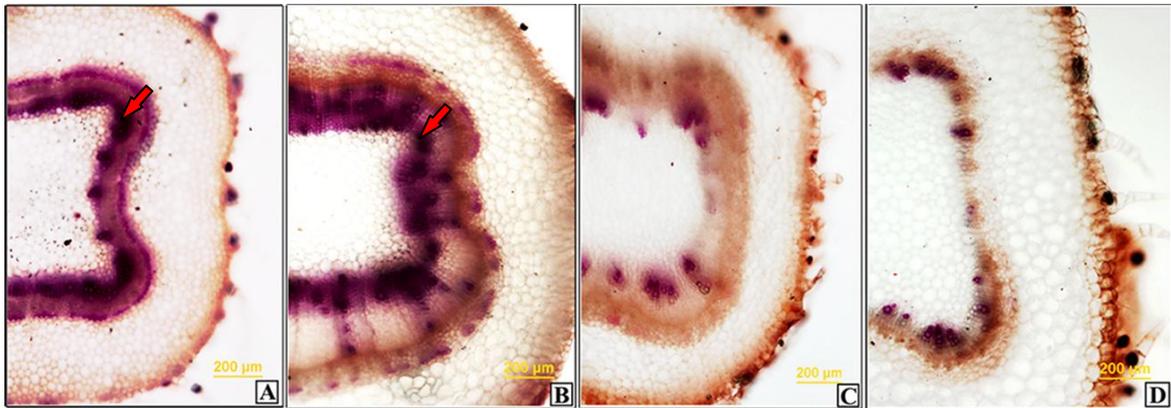


Figura 10. Secciones transversales de tallos (tinción con floroglucinol-HCl) de brotes de *Tectona grandis* L., cultivados con diferentes concentraciones de 6-BAP en los SIT a las cuatro semanas de cultivo. (A) Sin 6-BAP. (B) 2,22 μM de 6-BAP. (C) 4,44 μM de 6-BAP. (D) 6,66 μM de 6-BAP (barra=200 μm , 40x). Las flechas indican región del xilema lignificada.

De acuerdo a Grace (2005), los compuestos fenólicos forman parte de la compleja red de defensa antioxidante de las plantas. En situaciones de estrés se produce una acumulación de compuestos fenólicos, los cuales dado su carácter antioxidante desempeñan un papel protector de las células ante la peroxidación lipídica en estas circunstancias. Teniendo en cuenta este criterio, los resultados podrían indicar que dada la elevada acumulación de fenoles en los brotes cultivados sin 6-BAP, estos brotes tienen una mayor capacidad antioxidante y podrían encontrarse en condiciones de estrés. Sin embargo, a la vez pudieran indicar que son capaces de responder adecuadamente a este tipo de estrés incrementando los niveles de sustancias antioxidantes como los compuestos fenólicos.

Todo lo contrario ocurre en los brotes cultivados con 4,44 y 6,66 μM de 6-BAP en los cuales la disminución del contenido de fenoles totales, la hipolignificación y la pobre organización del xilema detectadas en el tejido vascular, podrían indicar una afectación del metabolismo de los compuestos fenólicos, el proceso de lignificación y la xilogénesis. Esto se correspondió además con el incremento del número de BH y el incremento proporcional del contenido de agua en los brotes, lo que sugiere que la escasez de este importante heteropolímero podría ser una de las causas de la hiperhidricidad. La escasa presencia de ligninas pudiera haber influido en que las

paredes celulares de las células del tejido vascular fueran menos hidrofóbicas y más permeables al agua, favoreciendo la hiperhidricidad.

Estudios comparativos realizados en tejidos normales e hiperhídricos de *Prunus avium* L. demuestran que la hipolignificación y el menor contenido de fenoles son características de los tejidos hiperhídricos, lo cual se correlacionó con una baja actividad o ausencia de enzimas involucradas en la polimerización de ligninas o la síntesis de sus precursores fenólicos (Gaspar, 1991; Perry *et al.*, 1999; Kevers *et al.*, 2004). Esto sugiere que el 6-BAP, al provocar la disminución del contenido de fenoles y de ligninas en los brotes, podría tener un efecto directo en la síntesis de proteínas involucradas en el metabolismo de los compuestos fenólicos y la polimerización de las ligninas o sus precursores.

Los fenoles tienen un importante papel en la protección contra la deshidratación y el ataque de patógenos durante la aclimatización, en el caso de la teca estos generalmente se acumulan en tricomas de tipo glandular-globoso y están presentes también en las plantas *in vivo* (Bandyopadhyay *et al.*, 2004). De manera que los resultados obtenidos indican, que las plantas de teca procedentes de los tratamientos con 4,44 y 6,66 μM de 6-BAP y mayormente las de este último tratamiento, las cuales tenían un bajo contenido de compuestos fenólicos y un sistema conductor poco lignificado, podrían ser más susceptibles a la deshidratación y al ataque de patógenos, que las plantas procedentes del tratamiento sin citoquinina o cultivadas con 2,22 μM de 6-BAP. Si a esto se añade el mayor contenido de agua y las anomalías del aparato estomático, con estomas marcadamente abiertos, lo cual se detectó en estos brotes cultivados con altas concentraciones de 6-BAP, entonces se puede predecir que estas plantas tendrán menos probabilidades de sobrevivir durante la aclimatización.

Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos

La cuantificación del contenido de pigmentos fotosintéticos mostró que el contenido de clorofila a, clorofila b, así como la relación clorofila a/clorofila b, no varió significativamente entre los tratamientos con 6-BAP y el control (Fig. 11). Sin embargo, con respecto al control, el contenido de carotenoides disminuyó significativamente en los tratamientos con 6-BAP, aunque no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

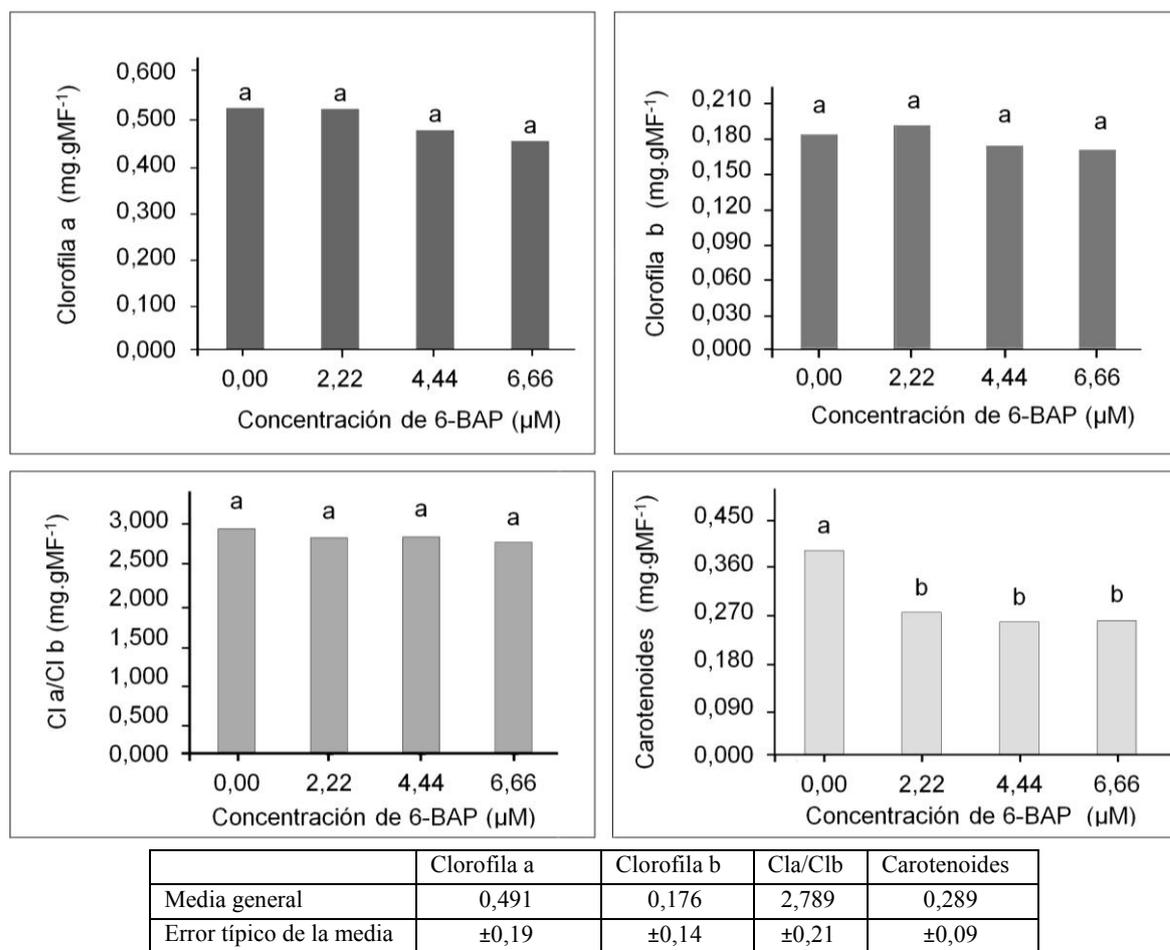


Figura 11. Contenido de carotenoides de brotes de *Tectona grandis* L. cultivados en los SIT con diferentes concentraciones de 6-BAP, a las cuatro semanas de cultivo. Medias con letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente (ANOVA simple; Tukey; $p \leq 0.05$, $n=27$).

Bassi y Caffari (2000) señalan que para los carotenoides se han descrito tres funciones fundamentales durante la fotosíntesis: 1) captación de luz y transferencia de la energía a las clorofilas; 2) extinción de la clorofila en estado triplete (excitada), con el objetivo de prevenir su reacción con el O_2 y evitar la formación de EROs, la cual tiene lugar en plantas carentes de carotenoides; 3) Regulación de la clorofila en estado singlete conduciendo a una modulación de la transferencia de energía a los centros de reacción fotosintéticos, protegiéndolos de la fotoinhibición ante exceso de luz.

En estudios realizados con plantas de *Nothofagus dombeyi* (Mirb) Oerst, Reyez-Díaz *et al.* (2009) describen que las plantas que no respondieron bien a tratamientos de frío, contenían menores niveles de carotenoides (ej. Xantofilas), fueron más susceptibles a las bajas temperaturas y experimentaron daños irreversibles del PSII. Los autores destacan además que aquellas plantas que toleraron las bajas temperaturas, cuando fueron expuestas a una alta irradiación, fueron capaces de

mantener un alto contenido de carotenoides y una elevada actividad del ciclo de las xantofilas, por lo que concluyen que estas características adaptativas son indicadoras de una mayor tolerancia a los cambios de temperatura y estrés.

Los carotenoides tienen la capacidad de disipar el exceso de energía que llega a la planta y así protegen a las clorofilas de la fotoxidación, con lo cual se reduce el riesgo de sufrir daños por fotoinhibición (Pandey *et al.*, 2005; Jeon *et al.*, 2005), de manera que aquellas plantas que tienen menor contenido de pigmentos fotosintéticos, dentro de ellos carotenoides de tipo xantofilas, poseen un sistema de fotoprotección reducido (Reyes-Díaz *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta los bajos niveles de antioxidantes de naturaleza carotenoide detectados en los brotes de teca cultivados con 6-BAP, en comparación con el control, los resultados indican que los brotes cultivados con 6-BAP podrían tener un sistema antioxidante y fotoprotector menos eficiente, por lo que podrían ser más susceptibles a los daños oxidativos y a la fotoinhibición.

Determinación del contenido endógeno de reguladores del crecimiento

La concentración de 6-BAP no influyó significativamente en el contenido de Z (Zeatina); mientras que la DHZ (Dihidroxizeatina), solo se detectó en el tratamiento control (17,83 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$). Sin embargo respecto al control, el contenido de zeatina ribósido (ZR) se incrementó proporcionalmente en los tratamientos con 4,44 y 6,66 μM de 6-BAP (50,18 y 117,18 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$), respectivamente y en los brotes cultivados con 2,22 μM de 6-BAP no se detectó la presencia de esta citoquinina libre (Fig. 12 A).

El contenido de citoquininas totales (Z+ZR+DHZ) disminuyó en los brotes cultivados con 2,22 μM (77,11 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$) respecto al control (117,16 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$) y se incrementó significativamente solo con la máxima concentración probada de 6,66 μM de 6-BAP (188,07 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$) (Fig. 12 B).

El mayor contenido endógeno de AIA se determinó en los brotes del tratamiento control (103,94 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$), mientras que la presencia de esta auxina no se detectó en los tratamientos con 6-BAP fue muy baja (Fig. 12 C). Con respecto al ABA, el mayor contenido fue detectado en los brotes del tratamiento control (10691,07 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$) y no se observaron diferencias significativas entre los brotes cultivados con 6-BAP (Fig. 12 D).

El mayor contenido de AJ se obtuvo en los brotes cultivados con 2,22 μM de 6-BAP (630,87 $\mu\text{g.gMF}^{-1}$), pero este disminuyó proporcionalmente con el incremento de la concentración

de 6-BAP, aunque los valores solo fueron significativos respecto al control ($378,59 \mu\text{g gMF}^{-1}$) cuando se utilizó una concentración de $6,66 \mu\text{M}$ de 6-BAP ($232,12 \mu\text{g.gMF}^{-1}$) (Fig. 12 E).

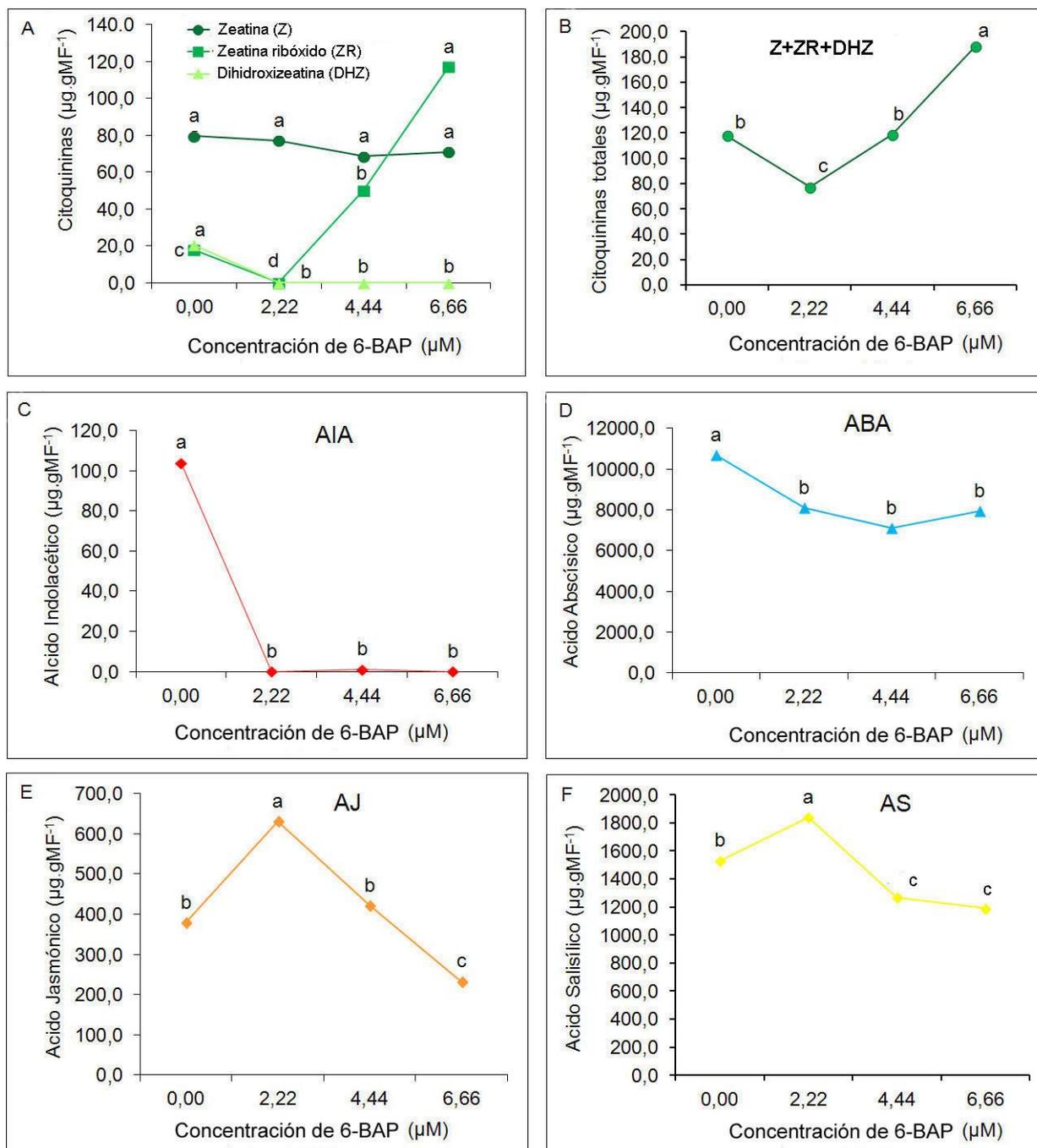


Figura 12. Contenido endógeno de reguladores del crecimiento de brotes de teca cultivados en los SIT a las cuatro semanas de cultivo. A) Contenido de Citoquininas. B) Contenido de citoquininas totales. C) Contenido de AIA. D) Contenido de ABA. E) Contenido de Acido Jasmónico. F) Contenido de Acido salicílico. Medias con letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA simple; Tukey; $p \leq 0,05$). Para el tratamiento estadístico, los datos fueron transformados de acuerdo con $x' = (x+0,5)^{0,5}$. Los datos que se presentan en la figura son no transformados, ($n=6$).

De forma similar ocurrió con el AS, el mayor contenido fue determinado en los brotes cultivados con $2,22 \mu\text{M}$ de 6-BAP ($1839,74 \mu\text{g.gMF}^{-1}$), concentraciones superiores de 6-BAP disminuyeron

significativamente el contenido endógeno en los brotes, aunque no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con 4,44 y 6,66 μM de 6-BAP (1266,97 y 1189,13 $\mu\text{g}\cdot\text{gMF}^{-1}$), respectivamente. En este último tratamiento, el contenido de AS fue incluso inferior al control (1529,28 $\mu\text{g}\cdot\text{gMF}^{-1}$) (Fig. 12 F).

El incremento de la concentración de 6-BAP favoreció el incremento de los niveles endógenos de citoquininas totales. Estos resultados coinciden con los descritos por Kataeva *et al.* (1991), Cañal *et al.* (2000), Centeno *et al.* (2003) y Moncaleán *et al.* (2005), los cuales refieren que la aplicación exógena de 6-BAP induce modificaciones en los niveles totales endógenos de citoquininas, incrementando generalmente los niveles de citoquininas libres o activas en especies como *Dianthus caryophyllus* L., *Actinidia deliciosa* L. y *Pinus pinea* L. Los resultados obtenidos, concuerdan además con los descritos por Vidal *et al.* (1994), quienes después del análisis bioquímico realizado en brotes de *Aesculus hippocastanum* L., refieren que el alto coeficiente de multiplicación estuvo asociado a elevados contenidos de citoquininas endógenas, lo cual provocó además una baja tasa de enraizamiento. En los brotes de teca con una concentración de 2,22 μM de 6-BAP se logra un coeficiente de multiplicación similar al descrito para los medios de cultivos semisólidos, se reduce significativamente el contenido de citoquininas endógenas al final del cultivo y el 50% de las plantas desarrollaron raíces.

Aunque puede parecer contradictorio, el hecho de que en los brotes cultivados sin 6-BAP se detectaron niveles de ZR superiores al tratamiento con 2,22 μM , este resultado no es incoherente y pudiera ser justificado por la presencia de raíces en todas las plantas de este tratamiento. Las raíces, tal como se ha descrito por otros autores constituyen el lugar de síntesis de las citoquininas libres como la Z y su ribósido (Barceló *et al.*, 2006).

El desarrollo morfogenético observado en los brotes cultivados sin 6-BAP, que estuvo caracterizado por la formación de un explante individual, sin el desarrollo de brotes axilares y la formación de raíces, podría ser también resultado del balance auxina/citoquinina. Teniendo en cuenta que los explantes fueron inoculados en los SIT en un medio de cultivo sin citoquinina, este balance desde el inicio pudiera haber sido cercano a la unidad, o sea un contenido similar de ambos reguladores del crecimiento. Con lo cual los niveles de citoquininas endógena no serían suficientes para romper la dominancia apical y evitar el efecto represor de las auxinas sobre los meristemas de las yemas caulinares, con lo cual se inhibió la formación de nuevos brotes y se

favoreció la emisión de raíces. Sin embargo, una vez que las raíces emergieron probablemente comenzaron a producir citoquininas, lo cual justificaría los niveles endógenos de Z, ZR, DHZ y citoquininas totales detectados en este tratamiento. Aunque, teniendo en cuenta el elevado contenido de AIA detectado en el tratamiento control, estos niveles aún fueron insuficientes para romper la dominancia apical, lo que inhibió el desarrollo de brotes axilares.

Las citoquininas libres como la zeatina y sus ribósidos son consideradas como formas activas (Letham y Palni, 1983), por lo que teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la cuantificación del contenido de citoquininas en los brotes de teca, se puede afirmar que el incremento del número de brotes que se obtuvo en las concentraciones de 6-BAP por encima de 2,22 μM , es el resultado de un balance endógeno auxina/citoquinina cada vez más favorable a las citoquininas en formas activas como la ZR. El valor más bajo de este balance se alcanzó con 6,66 μM , lo cual es sustentado por los mayores niveles de ZR y de citoquininas totales, así como el menor contenido de AIA detectados en este tratamiento. Esta sobreacumulación de citoquininas endógenas principalmente en formas activas, podría ser además la causa del elevado número de BH que se obtienen en este tratamiento. Esta hipótesis ha sido sostenida por diferentes autores, los cuales señalan que altas concentraciones de 6-BAP superiores a 4,44 de 6-BAP, inducen una sobreacumulación endógena de citoquininas libres y provocan hiperhidricidad en cultivos como *Aloe polyphylla* L. (Ivanova, 2009) y *Actinidia deliciosa* L. (Centeno *et al.*, 2003; Moncaleán *et al.* 2009).

El mayor contenido de ABA se determinó en los brotes del control. Los niveles de ABA se incrementan en las plantas generalmente por estrés abiótico (hídrico o bajas temperaturas) (Munne-Bosch y Lalueza, 2007; Tossi *et al.*, 2012). El ABA regula la expresión de genes cuyos productos protegen los tejidos vegetales de la deshidratación (Nilson y Assmann, 2007) y bajo estas condiciones el ABA promueve el cierre estomático (Pospíšilová *et al.*, 2009). El mayor contenido de ABA detectado en los brotes del control justifica la presencia de estomas en su mayoría cerrados detectados en este tratamiento y confirman la presencia de estomas funcionales, capaces de responder adecuadamente a los niveles de ABA, al igual que lo harían las plantas in vivo. Otro proceso morfogénico asociado al ABA ha sido la rizogénesis. La señal del ABA puede ocurrir desde largas distancias, desde la raíz hasta las hojas a través del xilema (Nilson y Assmann, 2007). Por ejemplo en *Zea maíz* L., se ha descrito que la acumulación de ABA mantiene

la elongación de la raíz principal bajo condiciones de estrés (De Smet *et al.*, 2003). Esta observación sobre el papel del ABA en la rizogénesis, sumado al elevado contenido de AIA detectado en los brotes cultivados sin 6-BAP, pudiera justificar la presencia de raíces en el 100% de las plantas del tratamiento control. Por otro lado, los resultados podrían indicar que las condiciones que se crean en los SIT en ausencia de 6-BAP generan un nivel de estrés en los brotes de tecla, que induce una respuesta de defensa similar a la que ocurre en las plantas en condiciones de estrés hídrico.

El contenido de ABA disminuyó en los brotes cultivados con 6-BAP con respecto al control. En las plantas la vía alternativa de síntesis de ABA a partir de los carotenoides (como zeaxantina), de ahí a xantoxina y luego ABA, es la más aceptada para explicar el efecto fisiológico del ABA (Taylor, 2005). De manera que los menores niveles de ABA en los brotes cultivados con 6-BAP podrían ser consecuencia del menor contenido de carotenoides cuantificado en estos brotes. La limitada capacidad de las plantas *in vitro* para producir ABA, constituye una de las principales causas de la pobre funcionalidad de los estomas (Santamaría *et al.*, 1993; Aguilar *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos confirman este planteamiento, si se tiene en cuenta que los menores niveles de ABA detectados en los brotes de tecla cultivados con 6-BAP se correspondió con la presencia de estomas más abiertos en comparación con el control.

Los niveles de ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS) se incrementaron con la concentración más baja de 6-BAP (2,22 μM). El AJ es conocido como la hormona del estrés (Van Dam y Bezemer, 2006), interactúa con otras hormonas en la regulación de diferentes respuestas a estrés y es promotor de defensa frente a patógenos (Lorenzo y Solano, 2005; Schillmiller y Howe, 2005) y de senescencia (Chen *et al.*, 2004). Este regulador del crecimiento interviene además en diferentes procesos morfo-fisiológicos, entre ellos el crecimiento de las raíces, plegamiento de proteínas, la fotosíntesis, el cierre de estomas y el ciclo celular (Suhita *et al.*, 2004). El AJ activa la expresión coordinada de genes involucrados en la acumulación de ascorbato, glutatión y cisteína e incrementa la actividad de la dehidroascorbato reductasa (Sekimoto *et al.*, 2005). Esta ruta metabólica antioxidante se activa bajo condiciones de estrés oxidativo y la activación coordinada de las proteínas implicadas en ella mediada por el AJ confiere a la planta resistencia a estrés ambiental (Afroz *et al.*, 2011).

En cuanto al AS, este parece jugar un papel fundamental en los mecanismos de defensa de las plantas, activando rutas que conducen a la expresión de genes de resistencia a diversos agentes abióticos, como los daños por frío (Durrant y Dong, 2004; Yang *et al.*, 2004). El AS podría además influir en la morfogénesis *in vitro*, por ejemplo la adición de AS al medio de cultivo, durante la propagación *in vitro* de *Lycopersicon esculentum* Mill, favoreció el enraizamiento *in vitro* y la aclimatización de plantas (del Valle *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que bajas concentraciones de 6-BAP (2,22 μM) generan condiciones de estrés en los brotes de teca, que induce una respuesta de defensa similar a la que ocurre en la plantas ante un ataque por patógenos, no así en las plantas cultivadas con concentraciones superiores de 6-BAP.

La cuantificación de los reguladores del crecimiento en los brotes de teca, permitió determinar que la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo influyó en el contenido endógeno de casi todos los reguladores del crecimiento. Los resultados sugieren que las condiciones de cultivo que se crean en los SIT, en ausencia de 6-BAP o con baja concentración de esta citoquinina (2,22 μM) pudieran generar un nivel de estrés en los brotes que conducen a la activación temprana de sus mecanismos de adaptación y defensa a estrés biótico y abiótico.

Los resultados obtenidos hasta aquí sugieren que la concentración de 2,22 μM de 6-BAP es de las estudiadas, la más adecuada para la multiplicación de brotes de teca en los SIT. Teniendo en cuenta que con esta concentración se logra un incremento del número de brotes (4,1 brote/explante), la ausencia de BH y la obtención de brotes con una morfología similar a las plantas *ex vitro*. Además, con un menor contenido de agua, estomas funcionales y un sistema vascular bien lignificado; así como con un mayor contenido de compuestos fenólicos y bajos niveles de citoquininas endógenas en formas activas, lo que indica mejor calidad morfo-fisiológica en comparación con los demás tratamientos con 6-BAP.

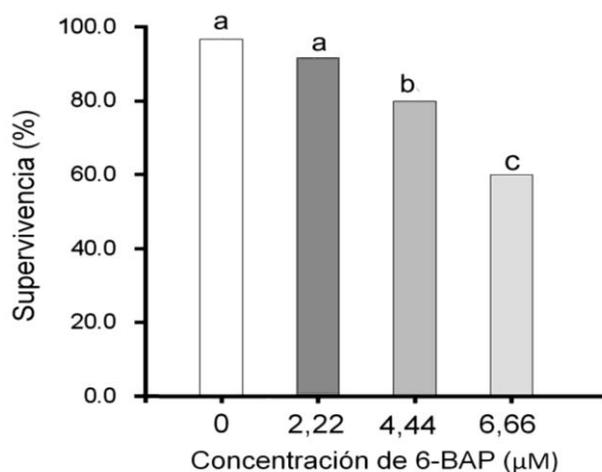
Evaluación de la supervivencia de las plantas en la fase de aclimatización

La evaluación de la supervivencia de las plantas de teca durante la aclimatización mostró que el incremento de la concentración de 6-BAP afectó el porcentaje de supervivencia *ex vitro*. La mayor supervivencia se obtuvo en las plantas procedentes del control y del tratamiento con 2,22 de μM de 6-BAP, con valores de 96,7 y 91,7%, respectivamente (Fig. 13). Concentraciones superiores de 6-BAP provocaron una disminución proporcional del porcentaje de supervivencia, los valores

alcanzados fueron de 80 y 60% en las plantas procedentes de los tratamientos con 4,44 y 6,66 μM de 6-BAP, respectivamente.

El alto porcentaje de supervivencia obtenido en las plantas cultivadas en los SIT sin 6-BAP y con 2,22 μM 6-BAP debe ser resultado de que estas plantas, desarrollaron un aparato estomático normal, con estomas capaces de cerrar adecuadamente. Sumado a esto, el desarrollo de un xilema bien organizado, con paredes celulares lignificadas adecuadamente, lo cual pudiera indicar que poseían un buen sistema conductor de agua y nutrientes. Por otra parte, estas plantas desarrollaron un mejor sistema de fotoprotección, defensa antioxidante, de respuesta a cambios ambientales y a estrés biótico y abiótico, dados por los mayores niveles acumulados de compuestos fenólicos, carotenoides, ABA, AJ y ASA. Todo esto indica que estaban mejor preparadas para evitar la pérdida de agua por transpiración y adaptarse a los cambios del ambiente *in vitro* a *ex vitro*.

A las cuatro semanas de realizada la transferencia *ex vitro*, las plantas procedentes del tratamiento con 2,22 μM de 6-BAP se observaban vigorosas, con hojas aovadas, de color verde oscuro y totalmente expandidas (Fig. 14).



Media general	84,6
Error típico de la media	$\pm 2,4$

Figura 13 Porcentaje de supervivencia de plantas de teca cultivadas en los SIT, a las cuatro semanas en la fase de aclimatización. Medias con letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA simple; Tukey; $p \leq 0,05$). Para el tratamiento estadístico, los datos fueron transformados de acuerdo con $x' = 2 \arccos(x/100)^{0,5}$. Los datos que se presentan en la figura son no transformados, ($n=90$).

El menor porcentaje de supervivencia se alcanzó en las plantas procedentes del tratamiento con 6,66 μM de 6-BAP, el cual coincidió con el mayor número de BH y el mayor contenido de agua en los brotes. Además, estos brotes fueron los que presentaron los estomas con mayor apertura y probablemente no funcionales, así como un menor contenido de sustancias antioxidantes y un

xilema con una pobre organización e hipolignificado. Todo esto sumado al posible efecto residual de citoquininas en formas activas debido a la sobreacumulación detectada en los mismos, que tal vez afectó el enraizamiento *ex vitro* determinaron que estas plantas sobrevivieran en menor porcentaje durante la aclimatización.

Los resultados confirman la importancia de un pretratamiento *in vitro*, donde las condiciones de cultivo conduzcan a la activación de mecanismos de respuestas a los cambios ambientales, que serán esenciales para la adaptación y el desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro*, lo cual es consistente con lo señalado con anterioridad por otros autores (Kadleček *et al.*, 2001; Hazarika 2006; Mocaleán *et al.*, 2009, Aragón *et al.*, 2010). En los SIT para los brotes de teca este pretratamiento se logró con el empleo de una concentración de 2,22 μM de 6-BAP..



Figura 14. Plantas de *Tectona grandis* L. en fase de aclimatización (cuatro semanas después de la transferencia) procedente del cultivo en SIT, con 2,22 μM de 6-BAP.

En concordancia con Hazarika (2006), los resultados alcanzados demuestran que la definición de las características morfo-anatómicas y fisiológicas de las plantas propagadas *in vitro*, permite una selección temprana de aquellas plantas que serán capaces de sobrevivir durante la aclimatización.

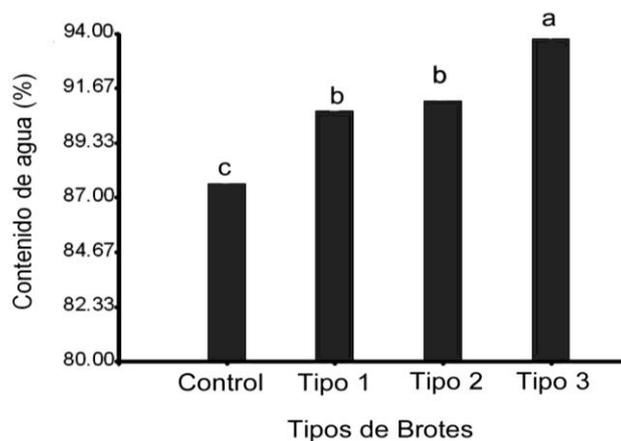
Las condiciones de cultivo que se crearon en los SIT, en ausencia de 6-BAP o con la presencia de esta citoquinina, pero en baja concentración (2,22 μM), permitieron obtener plantas de mejor calidad morfo-fisiológica. Estas condiciones de cultivo, más que provocarles un estrés que las afecte, generan un nivel de estrés que induce desde la fase *in vitro* mecanismos de respuesta temprana, que les permiten adaptarse a los cambios ambientales, por lo que sobreviven mejor durante la aclimatización.

Los resultados obtenidos en este acápite permiten seleccionar la concentración de 2,22 μM 6-BAP como el mejor tratamiento para la multiplicación de los brotes de teca en los SIT, con la cual se logra un incremento del número de brotes (4,1 brote/explante) y la obtención de plantas de buena calidad morfo-fisiológica, que sobreviven en un alto porcentaje (91,7%) durante la aclimatización.

4.2. Caracterización morfo-anatómica y fisiológica de brotes de teca (*Tectona grandis* L.) durante la inducción de la respuesta hiperhídrica.

Determinación del contenido de agua

Los brotes cultivados con 6-BAP acumularon un mayor contenido de agua que los brotes control. El mayor contenido se determinó en los brotes Tipo 3 (93,83%), lo que coincidió con la aparición de los rasgos hiperhídricos. No se encontraron diferencias significativas entre los brotes Tipo 1 (90,7 %) y Tipo 2 (91,12%).



Media general	90,81
Error típico de la media	$\pm 1,1$

Figura 16. Contenido de agua en diferentes tipos de brotes de *Tectona grandis* L., a las cuatro semanas de cultivo en los SIT. Medias con letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA simple; Tukey; $p \leq 0,05$). Para el tratamiento estadístico, los datos fueron transformados de acuerdo con $x' = 2 \arccos(x/100)^{0,5}$. Los datos que se presentan en la figura son no transformados, ($n=90$). Leyenda: **Control**: brotes cultivados sin 6-BAP, **Tipo 1**, **Tipo 2** y **Tipo 3**: brotes cultivados con 4,44 μM de 6-BAP.

El contenido de agua es un marcador fisiológico que define la calidad de los brotes *in vitro*. En los tejidos hiperhídricos, el agua se retiene en los espacios intercelulares o en forma de capa, la cual rodea las células del parénquima esponjoso. Esta película de agua impide la llegada de oxígeno a las células y provoca estrés por hipoxia (Gaspar *et al.*, 2002). Sin embargo, la causa fundamental por la cual se acumula el agua en los tejidos podría ser multifactorial (Kevers *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos demuestran que el cambio de coloración de los brotes de un color verde oscuro, hacia un verde claro, así como el cambio en la forma aovada de las hojas hacia una forma

cada vez más lanceolada son indicadores tempranos de un incremento progresivo del contenido de agua en los brotes y por tanto de la inducción de una respuesta hiperhídrica.

Caracterización de la anatomía foliar mediante MEB

El análisis morfométrico del complejo estomático mostró que el área de la hoja disminuyó significativamente de los brotes Tipo 2 al Tipo 3, con valores de 2,39 y 2,09 cm², respectivamente (Tabla 3). Mientras que la densidad estomática, se incrementó significativamente del Tipo 1 al Tipo 2 (616 y 652 estomas/mm², respectivamente), aunque no se observaron diferencias significativas entre los brotes Tipo 2 y Tipo 3.

Tabla 3. Análisis morfométrico de la superficie de la hoja de brotes de *Tectona grandis* L. en diferentes tipos de brotes, obtenidos en los sistemas de inmersión temporal a las cuatro semanas de cultivo.

Tipo de brotes	Control	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
** Área de la hoja (cm ²)	2,34±0,08 a	2,43±0,13 a	2,39±2,11a	2,09±0,44 b
*** Densidad estomática (mm ²)	608±4,06 b	616±3,82 b	652±4,17 a	667±4,16 a
*** Largo del estoma (µm)	13,47±0,56d	21,5±0,92c	24,18±1,06b	28,96±1,42a
*** Ancho del estoma (µm)	10,88±1,72d	17,01±1,33c	21,03±1,00b	28,65±3,81a
*** Área del estoma (µm ²)	134,4±4,74d	285,70±5,06c	417,82±3,87b	561,39±3,98a
*** Largo del poro (µm)	6,61±1,41d	10,97±0,72c	13,01±0,61b	14,84±1,51a
*** Ancho del poro (µm)	1,46±0,12d	4,61±1,17c	11,12±0,95b	14,58±1,26a
*** Área del poro (µm ²)	8,12±0,50d	44,93±1,01c	90,66±1,90b	191,01±3,20a

Medias con letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente (ANOVA simple; Tukey; p<0,05. Los valores representan la media±error estándar (** n=20, *** n=25). Leyenda: **Control**: brotes cultivados sin 6-BAP, **Tipo 1**, **Tipo 2** y **Tipo 3**: brotes cultivados con 4,44 µM de 6-BAP.

Los resultados demostraron que el tamaño del estoma y la dimensión del poro estomático se incrementaron proporcionalmente de un tipo de brote a otro, a medida que fueron más evidentes los rasgos de hiperhidricidad. De forma similar ocurrió con el área del estoma y del poro estomático. En cuanto a la variable área del estoma, los valores indican que esta se duplicó de un tipo de brote a otro, mientras que respecto al control, el área del poro estomático se incrementó cinco veces en los brotes de Tipo 1 y a partir de aquí se duplicó de un tipo de brote a otro.

En los brotes Tipo 3, el largo y ancho del estoma fueron casi iguales (28,96 x 28,65 µm, respectivamente), de forma similar sucedió para el largo y ancho del poro estomático (14,84 x

14,58 μm , respectivamente). Estos resultados indican que los estomas de los brotes Tipo 3, pierden la forma elíptica, típica de los estomas, para adoptar forma mas circular o de anillos, lo cual podría ser debido a la excesiva turgencia de las células oclusivas. Observaciones similares fueron descritas por Ziv *et al.* (1987), estos autores refieren que en hojas hiperhídricas de clavel (*Dianthus caryophyllus L.*) el poro estomático fue más circular en comparación con la forma elíptica de los estomas en hojas normales.

La observación de la superficie abaxial de las hojas de los brotes mostró que en los brotes del control y los brotes Tipo 1 las nervaduras eran normales, sin síntomas de engrosamiento (Figs. 17A y 17B). En las hojas de los brotes Tipo 2 y Tipo 3 las nervaduras se observaban engrosadas y de forma mas marcada en el Tipo 3 (Figs. 17C y D)

Los estomas en los brotes del control y de Tipo 1 presentaban forma elíptica. Estos se observaban cerrados y hundidos en el parénquima de la hoja en el control (Fig. 17E); mientras que en el Tipo 1 se observaban generalmente abiertos y situados en su mayoría al mismo nivel de las células de la epidermis (Fig. 17F).

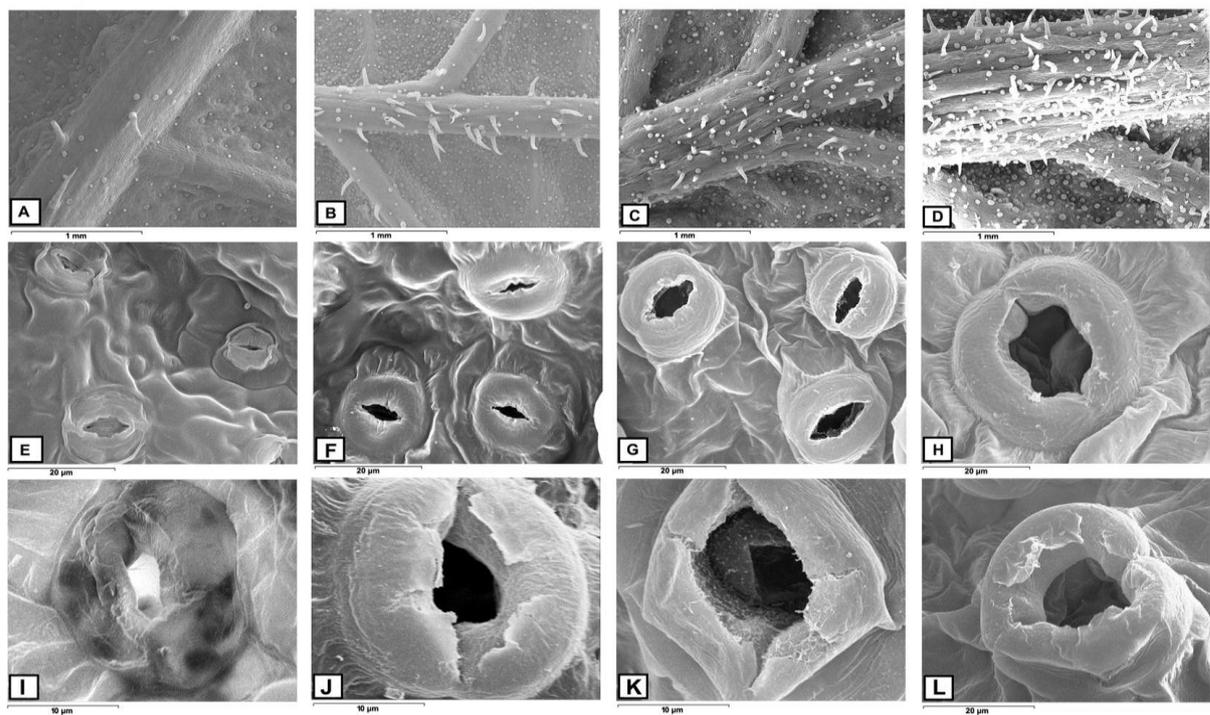


Figura 17. Comparación de la superficie abaxial (microscopía electrónica de barrido) de la hoja de diferentes tipos de brotes de *Tectona grandis L.*, obtenidos en los SIT a las cuatro semanas de cultivo. A, E) Control. B, F) Tipo 1. C, G) Tipo 2. D, H) Tipo 3. I, J, K, L) Fotomicrografía ampliada de estomas en los brotes Tipo 3, con daños en las células oclusivas. A,B,C,D, barra=1mm (270x). E,F,G,H,L, barra=20 μm (2000x). I,J,K, barra= 10 μm , (4000x).

En los brotes Tipo 2 los estomas presentaron también forma elíptica pero en comparación con los brotes del control y de Tipo 1 se encontraban más abiertos y elevados sobre la epidermis (Fig. 17G). Sin embargo, en el Tipo 3 los estomas tenían forma de anillos, se observaban marcadamente abiertos y elevados sobre la epidermis, algunos de ellos deformados y otros con daños en las células oclusivas (Figs. 17H).

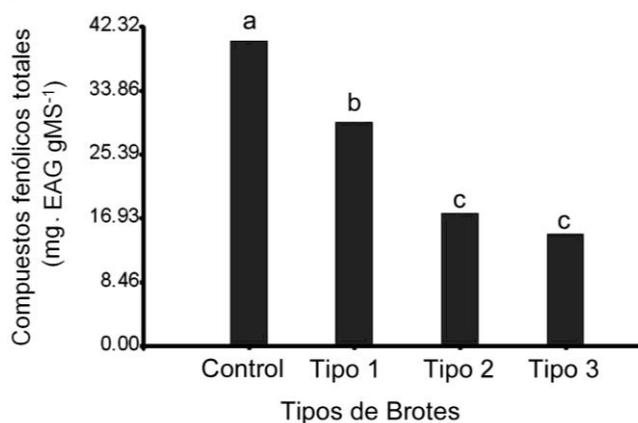
El mayor grado de desorden del aparato estomático se observó en los brotes Tipo 3, lo que correspondió con la apariencia hiperhídrica y el mayor contenido de agua. Esto sugiere que probablemente existió un incremento del contenido de agua en las células oclusivas, lo que justificaría la mayor apertura estomática determinada mediante el análisis morfométrico. Estos resultados coinciden con los descritos en hojas hiperhídricas de *Simmondsia chinensis* (Link), donde estudios realizados mediante MEB revelaron la presencia de cutículas delgadas y estomas deformados en comparación con las hojas normales (Apóstolo y Llorente, 2000). Otros estudios de este tipo, realizados en hojas hiperhídricas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), determinaron que la gran mayoría de los estomas se encontraban elevados sobre las células de la epidermis y marcadamente abiertos (Majada *et al.*, 2001), características similares a las encontradas en los estomas de los brotes Tipo 3. Los resultados sugieren que estos brotes, debido a la pérdida de la típica forma elíptica de los estomas y a los daños observados en los mismos podrían poseer estomas no funcionales. El tamaño del complejo estomático es controlado por el volumen relativo de las células oclusivas en dependencia del grado de turgidez y este a su vez depende del potencial mátrico e hídrico (Nobel, 2009), de modo que el hecho de que los estomas no cierren adecuadamente en las hojas hiperhídricas pudiera ser debido a dos factores: una pared celular con propiedades anormales o a una inadecuada función del protoplasto o incluso a ambos factores. Sin embargo, quedó demostrado por Ziv *et al.* (1987) que la no funcionalidad del protoplasto no es la causa principal de un cierre incorrecto de los estomas en hojas hiperhídricas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), los autores concluyen que esta anomalía podría ser debida a defectos en las propiedades de la pared celular de las células oclusivas. Estudios histoquímicos realizados en células oclusivas de plantas hiperhídricas de *Dianthus caryophyllus* L. han revelado bajos niveles de ligninas, celulosa, pectinas y cutinas, así como depósitos de calosa en comparación con las plantas normales (Kevers y Gaspar, 1986; Ziv y Ariel, 1992). Estos defectos podrían ser el resultado de errores en el proceso de división celular durante la formación de las nuevas células,

así como a deficiencias de sustancias pécticas y celulosa durante la formación de las paredes secundarias (Ziv y Ariel, 1992). La causa de la mayor apertura estomática encontrada en los brotes Tipo 3, pudiera ser por un incremento del contenido de agua en la célula oclusiva, debido probablemente a propiedades anormales de la pared celular.

Los resultados de la MEB y el análisis morfométrico revelaron que los cambios observados en la morfología de los brotes de teca, estuvo asociada con cambios en el aparato estomático de los brotes y que la inducción de la respuesta hiperhídrica implicó la presencia de estomas de mayor tamaño, cada vez más abiertos y con daños estructurales.

Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales

Se observó una disminución proporcional del contenido de compuestos fenólicos totales de los brotes Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3, con respecto a los brotes del control (Fig. 18), aunque no se observaron diferencias significativas entre los brotes Tipo 2 y el Tipo 3. Los valores acumulados en el control (40,2 mg EAG.g⁻¹ MS) fueron los más elevados, casi el doble de los niveles encontrados en los brotes de Tipo 2 y Tipo 3 (17,5 y 14,8 mg EAG. g⁻¹ MS).



Media general	25,1
Error típico de la media	±3,2

Figura 18. Contenido de compuestos fenólicos totales de brotes de *Tectona grandis* L. en diferentes tipos de brotes, obtenidos en los SIT a las cuatro semanas de cultivo. Medias con letras distintas difieren estadísticamente (ANOVA simple; Tukey; $p \leq 0,05$). Leyenda: **Control**: brotes cultivados sin 6-BAP, **Tipo 1**, **Tipo 2** y **Tipo 3**: brotes cultivados con 4,44 μM de 6-BAP.

El menor contenido de fenoles coincidió con los cambios en la morfología de las hojas y el incremento del contenido de agua en los brotes en los brotes Tipo 2 y Tipo 3. Sin embargo, no existieron diferencias en el contenido de fenoles entre estos dos tipos de brotes, lo que indica que

aún cuando los brotes Tipo 2 no presentaron apariencia vítrea, existen en ellos cambios a nivel bioquímico similar al de los BH (Tipo 3).

La hiperhidricidad ha sido asociada con varios cambios bioquímicos, dentro de ellos el metabolismo de los fenoles (Kevers *et al.*, 2004) y se ha demostrado que el contenido de fenoles totales en los BH, es menor que en los brotes normales (Perry *et al.* (1999). Los compuestos fenólicos forman parte del sistema de defensa antioxidante, debido a su bajo potencial redox, los fenoles son termodinámicamente capaces de inactivar de forma efectiva las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Grace, 2005). El menor contenido de compuestos fenólicos totales en los brotes de teca Tipo 2 y Tipo 3 sugiere entonces una disminución de la capacidad antioxidante en este tipo de brotes.

Los resultados demuestran que los cambios observados en la morfología de los brotes de teca, estuvieron asociados a una disminución del contenido de compuestos fenólicos, lo que sugiere que la inducción de la respuesta hiperhídrica podría implicar una disminución de la capacidad antioxidante de los brotes.

Detección de ligninas en secciones transversales del tallo

La tinción con floroglucinol-HCl de secciones transversales de los tallos demostró que en los brotes Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3, la presencia de ligninas fue escasa en las células del tejido conductor, en comparación con los brotes del control.

El sistema vascular de los brotes del control mostró un área teñida de color magenta bien definida, con un patrón de deposición de ligninas homogéneo y un xilema bien organizado (Fig. 19A); mientras que en los brotes Tipo 1, el patrón de deposición de ligninas fue inconsistente y aunque el xilema se observó organizado, este mostraba escasa lignificación (Fig. 19B).

En los brotes Tipo 2 y Tipo 3, se observó un xilema poco organizado, con escasa lignificación y un patrón de deposición de ligninas inconsistente y poco identificable (Figs. 19 C y D), lo que coincidió con un menor contenido de compuestos fenólicos totales y un mayor contenido de agua en los brotes. Esto indica que la hipolignificación podría ser una de las causas de la hiperhidricidad en los brotes de teca.

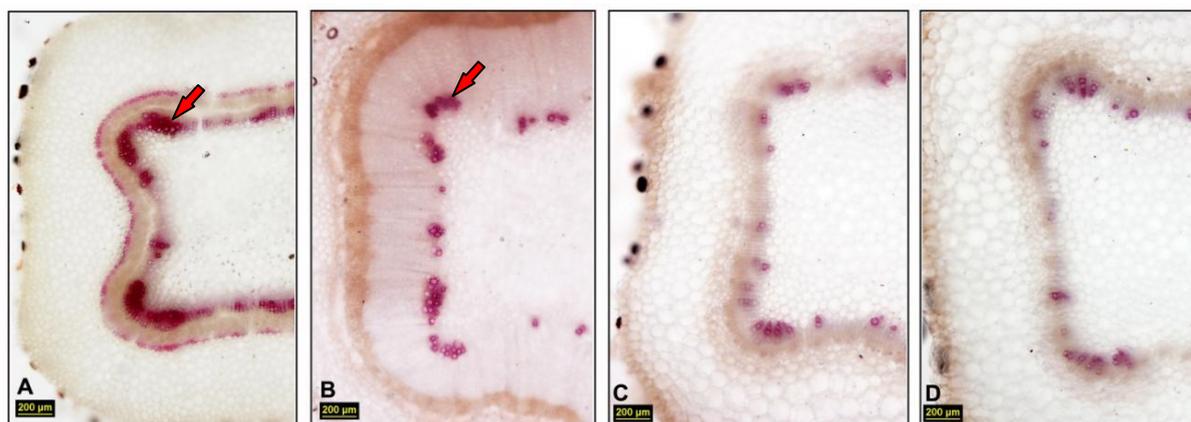


Figura 19. Secciones transversales de tallos, teñidos con floroglucinol-HCl, en diferentes tipos de brotes de *Tectona grandis* L., obtenidos en los SIT a las cuatro semanas de cultivo. A) Control. B) Tipo 1. (C) Tipo 2. D) Tipo 3 (barra=200 μ m, 40x). Las flechas indican región del xilema lignificada.

Se ha demostrado que la hipolignificación es una característica de los tejidos hiperhídricos (Gaspar *et al.*, 1991; Hazarika, 2006). Estudios histoquímicos realizados en secciones transversales de BH de *Simmondsia chinensis* (Link) (Apóstolo y Llorente, 2000), también revelaron una escasa lignificación y una pobre organización del xilema, en comparación con los brotes normales. Características similares del xilema, así como la hipolignificación del tejido vascular fueron confirmados en estudios histoquímicos realizados en BH de *Vanilla planifolia* L. (Sreedhar *et al.*, 2009), estudios previos realizados en esta misma especie señalaban que la existencia de un tejido vascular poco organizado e hipolignificado, podría estar asociado con deficiencias en la síntesis de ligninas y a la degradación de la estructura de la pared celular secundaria (George, 1996).

El cambio en la morfología de los brotes de teca y la apariencia vítrea, que implicó un incremento del contenido de agua, estuvo asociado a una reducción del contenido de fenoles e hipolignificación, lo que sugiere una afectación del metabolismo de los compuestos fenólicos, probablemente la formación de ligninas o sus precursores, lo cual podría ser una de las causas de la hiperhidricidad.

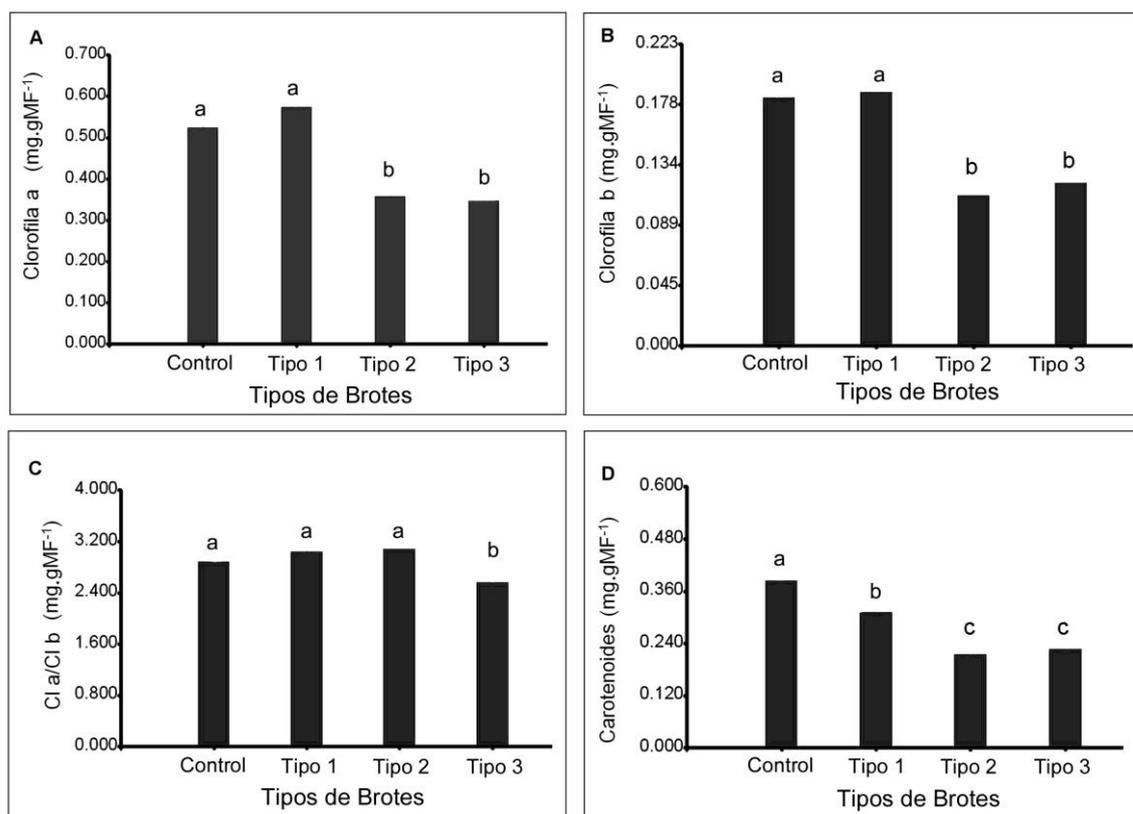
Los resultados sugieren que la respuesta hiperhídrica pudiera implicar la formación de un tejido vascular hipolignificado y por tanto poco eficiente para conducir el agua y los nutrientes.

Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos

Se observaron cambios en el contenido de pigmentos fotosintéticos en los diferentes tipos de brotes cultivados en los SIT con 4,44 μ M de 6-BAP (Fig. 20).

En los brotes control y de Tipo 1 los niveles de Clorofila a y Clorofila b fueron similares (Figs. 20A y B). Sin embargo, el contenido de ambos pigmentos fotosintéticos disminuyó en el Tipo 2 y el Tipo 3, aunque no se observaron diferencias significativas entre estos dos tipos de brotes.

En cuanto a la relación Clorofila a/Clorofila b, no se observaron diferencias significativas entre los brotes del control, Tipo 1 y Tipo 2, pero disminuyó significativamente en los brotes Tipo 3 (Fig. 20C).



	Clorofila a	Clorofila b	Cl a/Cl b	Carotenoides
Media general	0,450	0,157	2,888	0,289
Error típico de la media	±0,09	±0,03	±0,15	±0,16

Figura 20. Contenido de pigmentos fotosintéticos en diferentes tipos de brotes de *Tectona grandis* L., obtenidos en los SIT a las cuatro semanas de cultivo. A) Clorofila a. B) Clorofila b. C) Relación clorofila a/clorofila b. D) Carotenoides. Medias con letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey; $p \leq 0,05$). Leyenda: **Control**: brotes cultivados sin 6-BAP, **Tipo 1**, **Tipo 2** y **Tipo 3**: brotes cultivados con 4,44 μM de 6-BAP.

El contenido de carotenoides disminuyó significativamente en los brotes cultivados con 6-BAP independientemente del tipo de brote, con respecto a los brotes del control, aunque no se observaron diferencias significativas entre los brotes Tipo 2 y Tipo 3 (Fig. 20D).

Estos resultados coinciden con los descritos para brotes hiperhídricos de *Vanillia planifolia* L. (Sreedhar *et al.*, 2009), donde los autores refieren una disminución significativa del contenido de clorofila a, clorofila b y carotenoides, en comparación con los brotes normales y señalan que la reducción del contenido de clorofilas fue uno de los primeros síntomas observados en los BH.

Teniendo en cuenta que en los brotes Tipo 2, no presentaban una apariencia vítrea, pero si un cambio en la forma de la hoja de ovada hacia lanceolada y de una coloración verde oscuro a verde claro, lo cual coincidió con una disminución del contenido de clorofilas y un incremento significativo del contenido de agua, se puede plantear que estos cambios morfológicos son marcadores tempranos de la inducción de una respuesta hiperhídrica en los brotes de teca.

Se ha descrito que en comparación con los brotes normales, los BH se caracterizan por tener menor contenido de clorofilas, lo cual podría ser la causa de su apariencia traslúcida (Gaspar *et al.*, 2002) y una de las causas de la ineficiencia fotosintética descrita para este tipo de brotes (Kevers *et al.*, 2004; Hazarika, 2006). Los carotenoides desempeñan dos funciones principales en las plantas. Por una parte, actúan como antenas alternativas absorbiendo luz no accesible a la clorofila. Por otra, impiden la fotooxidación del aparato fotosintético mediante la extinción del estado triplete de clorofila y la eliminación de especies reactivas de oxígeno (EROs), que se generan en el cloroplasto como consecuencia de las reacciones primarias de la fotosíntesis (Woodall *et al.*, 1997). Los carotenoides, especialmente los de tipo xantofilas juegan un importante papel en la protección adicional del aparato fotosintético contra el daño oxidativo (Gaspar *et al.*, 2002), estos son además los precursores del ABA, por lo que podrían tener una implicación indirecta en los procesos de adaptación a diversos tipos de estrés (Zhu, 2002). Se demostró que el 6-BAP afecta el contenido de carotenoides, los cuales son precursores del ABA y en acápites anteriores quedó demostrado que el 6-BAP favoreció también la apertura estomática, de manera que esta citoquinina al disminuir el contenido de carotenoides, podría afectar la formación de ABA e indirectamente favorecer la apertura estomática.

La disminución del contenido de carotenoides en los brotes cultivados con 6-BAP, sugieren una disminución de la capacidad antioxidante y de fotoprotección en estos brotes, mayoritariamente en los de Tipo 2 y Tipo 3, en los cuales se habían observado cambios morfológicos en la forma y coloración de la hoja, así como una apariencia vítrea y un mayor contenido de agua en el caso de los brotes Tipo 3. Lo que coincidió además con la presencia de estomas marcadamente abiertos,